

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

|   |  |
|---|--|
| <b>Date d'expédition</b> (jour/mois/année)<br>01 août 2000 (01.08.00)               |  |
| <b>Demande internationale no</b><br>PCT/FR99/02826                                  | <b>Référence du dossier du déposant ou du mandataire</b><br>MJPCb191/155 |
| <b>Date du dépôt international</b> (jour/mois/année)<br>18 novembre 1999 (18.11.99) | <b>Date de priorité</b> (jour/mois/année)<br>18 novembre 1998 (18.11.98) |
| <b>Déposant</b><br>CAYUELA, Chantal etc   |  |

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

06 juin 2000 (06.06.00)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

|   |   |
|---|---|
| <b>Bureau international de l'OMPI</b><br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Genève 20, Suisse<br>no de télécopieur: (41-22) 740.14.35 | <b>Fonctionnaire autorisé</b><br>R. Forax<br>no de téléphone: (41-22) 338.83.38 |
|---|---|

**Translation**  
09/856 969

PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

**RECEIVED**  
FEB 4 2002  
TECH CENTER 1600 1900

|  |   |   |  |
|--|---|---|--|
| Applicant's or agent's file reference<br>MJPCb191/155                                      |   | <b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) |  |
| International application No.<br>PCT/FR99/02826  | International filing date (day/month/year)<br>18 November 1999 (18.11.99) | Priority date (day/month/year)<br>18 November 1998 (18.11.98)   |  |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC<br>A61K 35/74 |   |   |  |
| Applicant<br>COMPAGNIE GERVAIS DANONE  |   |   |  |

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

|   |  |
|---|--|
| Date of submission of the demand<br>06 June 2000 (06.06.00) | Date of completion of this report<br>07 August 2000 (07.08.2000) |
| Name and mailing address of the IPEA/EP                     | Authorized officer   |
| Facsimile No.   | Telephone No.  |

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/02826

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description. pages 1-11 . as originally filed.  
 pages \_\_\_\_\_ . filed with the demand.  
 pages \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_ .  
 pages \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_ .
- ☒ the claims. Nos. 1-9 . as originally filed.  
 Nos. \_\_\_\_\_ . as amended under Article 19.  
 Nos. \_\_\_\_\_ . filed with the demand.  
 Nos. \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_ .  
 Nos. \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_ .
- ☒ the drawings. sheets/fig 1/4-4/4 . as originally filed.  
 sheets/fig \_\_\_\_\_ . filed with the demand.  
 sheets/fig \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_ .  
 sheets/fig \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_ .

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description. pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims. Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings. sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/FR 99/02826

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

|                               |        |     |     |
|-------------------------------|--------|-----|-----|
| Novelty (N)                   | Claims | 1-9 | YES |
|                               | Claims |     | NO  |
| Inventive step (IS)           | Claims | 1-9 | YES |
|                               | Claims |     | NO  |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-9 | YES |
|                               | Claims |     | NO  |

### 2. Citations and explanations

#### NOVELTY, INVENTIVE STEP AND INDUSTRIAL APPLICABILITY - PCT ARTICLE 33(1) (2) (3) AND (4)

1. Claims 1-9 appear to be novel, inventive and industrially applicable in view of the prior art cited in the Search Report

1.1 No single document of the prior art cited in the Search Report either describes or suggests:

(i) the use of a lactic acid bacteria strain capable of reducing the production of NO by enterocyte cultures preactivated by proinflammatory cytokines, and by bacterial LPS, to obtain a composition regulating the inflammatory response of enterocytes, as described in Claims 1-6, and/or

(ii) a method for screening of new lactic acid bacteria strains having properties for modulating non-specific immunity, characterised in that it comprises the selection of lactic acid bacteria strains capable of inhibiting the production of NO by enterocyte cultures

preactivated by proinflammatory cytokines, and  
by bacterial LPS, as described in Claims 7-9.

Hence Claims 1-9 can be considered novel, and  
inventive and, furthermore, industrially applicable.

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

### RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



|   |  |  |
|---|--|--|
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire<br>MJPCb191/155   | <b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416) |  |
| Demande internationale n°<br>PCT/FR99/02826   | Date du dépôt international (jour/mois/année)<br>18/11/1999  | Date de priorité (jour/mois/année)<br>18/11/1998 |
| Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB<br>A61K35/74 |  |  |
| Déposant<br>COMPAGNIE GERVAIS DANONE et al.   |  |  |

- Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
- Ce RAPPORT comprend 4 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
  - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

- Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

|  |   |
|--|---|
| Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale<br>06/06/2000  | Date d'achèvement du présent rapport<br>07.08.2000  |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:<br> Office européen des brevets<br>D-80298 Munich<br>Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d<br>Fax: +49 89 2399 - 4465 | Fonctionnaire autorisé<br>Fayos, C<br>N° de téléphone +49 89 2399 2180<br> |

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02826

**I. Base du rapport**

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

**Description, pages:**

1-11                      version initiale

**Revendications, N°:**

1-9                      version initiale

**Dessins, feuilles:**

1/4-4/4                      version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description,      pages :
- ☐ des revendications,    n°s :
- ☐ des dessins,            feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02826

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

**1. Déclaration**

|  |                          |
|--|--------------------------|
| Nouveauté                              | Oui : Revendications 1-9 |
|  | Non : Revendications     |
| Activité inventive                     | Oui : Revendications 1-9 |
|  | Non : Revendications     |
| Possibilité d'application industrielle | Oui : Revendications 1-9 |
|  | Non : Revendications     |

**2. Citations et explications**

**voir feuille séparée**



**Concernant le point V**

**Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

**NOUVEAUTÉ, ACTIVITÉ INVENTIVE et POSSIBILITÉ D'APPLICATION INDUSTRIELLE**  
**- Art. 33 (1) (2) (3) et (4) PCT**

**1- Les revendications 1-9 paraissent être nouvelles, inventives et industriellement applicables au vu de l'art antérieur cité dans le rapport de recherche.**

1.1- Aucun des documents de l'art antérieur cité dans le rapport de recherche ne décrit ni suggère:

- (i) l'utilisation d'une souche de bactérie lactique capable de diminuer la production de NO par des cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines proinflammatoires et des LPS bactériens, pour l'obtention d'une composition régulatrice de la réponse inflammatoire des entérocytes tel qu'il est décrit dans les revendications 1-6 et / ou
- (ii) Un procédé de criblage de nouvelles souches de bactéries lactiques dotées de propriétés modulatrices de l'immunité non-spécifique, caractérisé en ce qu'il comprend la sélection de souches de bactéries lactiques capables d'inhiber la production de NO par de cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires et des LPS bactériens tel qu'il est décrit dans les revendications 7-9.

C'est pourquoi les revendications 1-9 peuvent être considérées nouvelles et inventives et présentent en outre la possibilité d'application industrielle.



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

|   |           |   |
|---|-----------|---|
| <b>(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> :</b><br><b>A61K 35/74, A23C 9/123, C12Q 1/02,</b><br><b>A61P 29/00, 1/00</b>  | <b>A3</b> | <b>(11) Numéro de publication internationale: WO 00/28943</b><br><br><b>(43) Date de publication internationale: 25 mai 2000 (25.05.00)</b>   |
| <b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR99/02826<br><br><b>(22) Date de dépôt international:</b> 18 novembre 1999 (18.11.99)<br><br><b>(30) Données relatives à la priorité:</b><br>98/14471                      18 novembre 1998 (18.11.98)                      FR<br><br><b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> COMPAGNIE<br>GERVAIS DANONE [FR/FR]; 126-130, rue Jules Guesde,<br>F-92302 Levallois-Perret (FR).<br><br><b>(72) Inventeurs; et</b><br><b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> CAYUELA, Chan-<br>tal [FR/FR]; 20, rue Spontini, F-75016 Paris (FR).<br>DUGAS, Nathalie [FR/FR]; 4, square des Muses, F-91370<br>Verrières-Le-Buisson (FR). POSTAIRE, Eric [FR/FR]; 4,<br>villa des Nouveaux, F-92170 Vanves (FR).<br><br><b>(74) Mandataires:</b> VIALLE-PRESLES, Marie-José etc.; Cabinet<br>Ores, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR). |           | <b>(81) Etats désignés:</b> AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY,<br>CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, GH, GM, HR,<br>HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,<br>LR, LS, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO,<br>NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,<br>TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO<br>(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet<br>eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet<br>européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,<br>IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF,<br>CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).<br><br><b>Publiée</b><br><i>Avec rapport de recherche internationale.</i><br><br><b>(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:</b><br>20 juillet 2000 (20.07.00) |

(54) Title: SELECTION AND USES OF LACTIC ACID BACTERIA STRAINS MODULATING NON-SPECIFIC IMMUNITY

(54) Titre: SELECTION ET UTILISATIONS DE SOUCHES DE BACTERIES LACTIQUES MODULATRICES DE L'IMMUNITÉ NON-SPECIFIQUE

## (57) Abstract

The invention concerns lactic acid bacteria strains capable of regulating the production of NO and inflammatory cytokines by enterocytes, depending on the inflammatory condition of said enterocytes. Said strains can also be incorporated in food supplements such as fermented dairy products used for regulating inflammatory response and non-specific immunity.

## (57) Abrégé

L'invention concerne des souches de bactéries lactiques capables de réguler la production de NO et de cytokines inflammatoires par des entérocytes, selon l'état inflammatoire de ces entérocytes. Ces souches peuvent être incorporées dans des compléments alimentaires tels que des produits laitiers fermentés utilisables pour réguler la réponse inflammatoire et l'immunité non-spécifique.

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

|    |                           |    |   |    |  |    |                       |
|----|---------------------------|----|---|----|--|----|-----------------------|
| AL | Albanie                   | ES | Espagne                                       | LS | Lesotho                                  | SI | Slovénie              |
| AM | Arménie                   | FI | Finlande                                      | LT | Lituanie                                 | SK | Slovaquie             |
| AT | Autriche                  | FR | France  | LU | Luxembourg                               | SN | Sénégal               |
| AU | Australie                 | GA | Gabon   | LV | Lettonie                                 | SZ | Swaziland             |
| AZ | Azerbaïdjan               | GB | Royaume-Uni                                   | MC | Monaco                                   | TD | Tchad                 |
| BA | Bosnie-Herzégovine        | GE | Géorgie                                       | MD | République de Moldova                    | TG | Togo                  |
| BB | Barbade                   | GH | Ghana   | MG | Madagascar                               | TJ | Tadjikistan           |
| BE | Belgique                  | GN | Guinée  | MK | Ex-République yougoslave<br>de Macédoine | TM | Turkménistan          |
| BF | Burkina Faso              | GR | Grèce   | ML | Mali                                     | TR | Turquie               |
| BG | Bulgarie                  | HU | Hongrie                                       | MN | Mongolie                                 | TT | Trinité-et-Tobago     |
| BJ | Bénin                     | IE | Irlande                                       | MR | Mauritanie                               | UA | Ukraine               |
| BR | Bésil                     | IL | Israël  | MW | Malawi                                   | UG | Ouganda               |
| BY | Bélarus                   | IS | Islande                                       | MX | Mexique                                  | US | Etats-Unis d'Amérique |
| CA | Canada                    | IT | Italie  | NE | Niger                                    | UZ | Ouzbékistan           |
| CF | République centrafricaine | JP | Japon   | NL | Pays-Bas                                 | VN | Viet Nam              |
| CG | Congo                     | KE | Kenya   | NO | Norvège                                  | YU | Yougoslavie           |
| CH | Suisse                    | KG | Kirghizistan                                  | NZ | Nouvelle-Zélande                         | ZW | Zimbabwe              |
| CI | Côte d'Ivoire             | KP | République populaire<br>démocratique de Corée | PL | Pologne                                  |    |                       |
| CM | Cameroun                  | KR | République de Corée                           | PT | Portugal                                 |    |                       |
| CN | Chine                     | KZ | Kazakstan                                     | RO | Roumanie                                 |    |                       |
| CU | Cuba                      | LC | Sainte-Lucie                                  | RU | Fédération de Russie                     |    |                       |
| CZ | République tchèque        | LI | Liechtenstein                                 | SD | Soudan                                   |    |                       |
| DE | Allemagne                 | LK | Sri Lanka                                     | SE | Suède                                    |    |                       |
| DK | Danemark                  | LR | Libéria                                       | SG | Singapour                                |    |                       |
| EE | Estonie                   |    |   |    |  |    |                       |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int l Application No

PCT/FR 99/02826

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K35/74 A23C9/123 C12Q1/02 A61P29/00 A61P1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K A23C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A          | T. WITTHÖFT ET AL.: "ENTEROINVASIVE BACTERIA DIRECTLY ACTIVATE EXPRESSION OF iNOS AND NO PRODUCTION IN HUMAN COLON EPITHELIAL CELLS."<br>AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: GASTROINTESTINAL AND LIVER PHYSIOLOGY, vol. 38, no. 3, September 1998 (1998-09), pages G564-G571, XP002115076<br>WASHINGTON, DC, US<br>cited in the application<br>page G568, left-hand column, paragraph 2<br>-page G569, right-hand column, paragraph 3 | 1-9                   |
| A          | WO 98 27991 A (LABORATOIRES STANDA S.A.)<br>2 July 1998 (1998-07-02)<br>claims   | 1-9                   |
|            | —<br>-/-   |                       |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 May 2000

Date of mailing of the international search report

18/05/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ryckebosch, A

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/02826

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A          | WO 96 20607 A (COMPAGNIE GERVAIS DANONE)<br>11 July 1996 (1996-07-11)<br>cited in the application<br>claims  | 1-9                   |
| P,X        | E. POSTAIRE ET AL.: "ROLE OF NITRIC OXIDE<br>IN THE MUCOSAL IMMUNO-REGULATORY<br>PROPERTIES OF PROBIOTIC STRAINS."<br>FASEB JOURNAL FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY,<br>vol. 13, no. 4,<br>12 March 1999 (1999-03-12), page A291<br>XP002137007<br>BETHESDA, MD US<br>abstract n°. 245.27 | 1-9                   |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02826

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9827991 A                              | 02-07-1998          | FR 2764801 A               | 24-12-1998          |
|   |                     | FR 2764802 A               | 24-12-1998          |
|   |                     | AU 5669098 A               | 17-07-1998          |
|   |                     | EP 0951290 A               | 27-10-1999          |
|   |                     | FR 2764803 A               | 24-12-1998          |
|   |                     | PL 334277 A                | 14-02-2000          |
| WO 9620607 A                              | 11-07-1996          | FR 2728912 A               | 05-07-1996          |
|   |                     | FR 2739869 A               | 18-04-1997          |
|   |                     | AT 173135 T                | 15-11-1998          |
|   |                     | AU 4489696 A               | 24-07-1996          |
|   |                     | CA 2209335 A               | 11-07-1996          |
|   |                     | DE 69506002 D              | 17-12-1998          |
|   |                     | DE 69506002 T              | 24-06-1999          |
|   |                     | EP 0794707 A               | 17-09-1997          |
|   |                     | ES 2126962 T               | 01-04-1999          |
|   |                     | GR 3029312 T               | 28-05-1999          |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. le internationale No

PCT/FR 99/02826

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K35/74 A23C9/123 C12Q1/02 A61P29/00 A61P1/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K A23C

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents  | no. des revendications visées |
|-------------|---|-------------------------------|
| A           | T. WITTHÖFT ET AL.: "ENTEROINVASIVE BACTERIA DIRECTLY ACTIVATE EXPRESSION OF INOS AND NO PRODUCTION IN HUMAN COLON EPITHELIAL CELLS."<br>AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: GASTROINTESTINAL AND LIVER PHYSIOLOGY, vol. 38, no. 3, septembre 1998 (1998-09), pages G564-G571, XP002115076<br>WASHINGTON, DC, US<br>cité dans la demande<br>page G568, colonne de gauche, alinéa 2<br>-page G569, colonne de droite, alinéa 3 | 1-9                           |
| A           | WO 98 27991 A (LABORATOIRES STANDA S.A.)<br>2 juillet 1998 (1998-07-02)<br>revendications   | 1-9                           |
|             | -/-   |                               |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

4 mai 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

18/05/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Ryckebosch, A

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De. de internationale No

PCT/FR 99/02826

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| A         | WO 96 20607 A (COMPAGNIE GERVAIS DANONE)<br>11 juillet 1996 (1996-07-11)<br>cité dans la demande<br>revendications   | 1-9                           |
| P,X       | E. POSTAIRE ET AL.: "ROLE OF NITRIC OXIDE<br>IN THE MUCOSAL IMMUNO-REGULATORY<br>PROPERTIES OF PROBIOTIC STRAINS."<br>FASEB JOURNAL FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY,<br>vol. 13, no. 4, 12 mars 1999 (1999-03-12),<br>page A291 XP002137007<br>BETHESDA, MD US<br>* résumé no. 245.27 * | 1-9                           |



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De de Internationale No

PCT/FR 99/02826

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) | Date de<br>publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| W0 9827991 A                                    | 02-07-1998             | FR 2764801 A                            | 24-12-1998             |
|   |                        | FR 2764802 A                            | 24-12-1998             |
|   |                        | AU 5669098 A                            | 17-07-1998             |
|   |                        | EP 0951290 A                            | 27-10-1999             |
|   |                        | FR 2764803 A                            | 24-12-1998             |
|   |                        | PL 334277 A                             | 14-02-2000             |
| W0 9620607 A                                    | 11-07-1996             | FR 2728912 A                            | 05-07-1996             |
|   |                        | FR 2739869 A                            | 18-04-1997             |
|   |                        | AT 173135 T                             | 15-11-1998             |
|   |                        | AU 4489696 A                            | 24-07-1996             |
|   |                        | CA 2209335 A                            | 11-07-1996             |
|   |                        | DE 69506002 D                           | 17-12-1998             |
|   |                        | DE 69506002 T                           | 24-06-1999             |
|   |                        | EP 0794707 A                            | 17-09-1997             |
|   |                        | ES 2126962 T                            | 01-04-1999             |
|   |                        | GR 3029312 T                            | 28-05-1999             |



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

|   |           |  |
|---|-----------|--|
| (51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> :<br><b>A61K</b>  | <b>A2</b> | (11) Numéro de publication internationale: <b>WO 00/28943</b><br><br>(43) Date de publication internationale: 25 mai 2000 (25.05.00)   |
| <p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02826</p> <p>(22) Date de dépôt international: 18 novembre 1999 (18.11.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité:<br/>98/14471 18 novembre 1998 (18.11.98) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): COMPAGNIE GERVAIS DANONE [FR/FR]; 126-130, rue Jules Guesde, F-92302 Levallois-Perret (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et<br/>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CAYUELA, Chantal [FR/FR]; 20, rue Spontini, F-75016 Paris (FR). DUGAS, Nathalie [FR/FR]; 4, square des Muses, F-91370 Verrières-Le-Buisson (FR). POSTAIRE, Eric [FR/FR]; 4, villa des Nouveaux, F-92170 Vanves (FR).</p> <p>(74) Mandataires: VIALLE-PRESLES, Marie-José etc.; Cabinet Ores, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).</p>  |           | <p>(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée<br/><i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i></p> |
| <p>(54) Title: SELECTION AND USES OF LACTIC ACID BACTERIA STRAINS MODULATING NON-SPECIFIC IMMUNITY</p> <p>(54) Titre: SELECTION ET UTILISATIONS DE SOUCHES DE BACTERIES LACTIQUES MODULATRICES DE L'IMMUNITÉ NON-SPECIFIQUE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns lactic acid bacteria strains capable of regulating the production of NO and inflammatory cytokines by enterocytes, depending on the inflammatory condition of said enterocytes. Said strains can also be incorporated in food supplements such as fermented dairy products used for regulating inflammatory response and non-specific immunity.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention concerne des souches de bactéries lactiques capables de réguler la production de NO et de cytokines inflammatoires par des entérocytes, selon l'état inflammatoire de ces entérocytes. Ces souches peuvent être incorporées dans des compléments alimentaires tels que des produits laitiers fermentés utilisables pour réguler la réponse inflammatoire et l'immunité non-spécifique.</p> |           |  |

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

|    |                           |    |   |    |  |    |                       |
|----|---------------------------|----|---|----|--|----|-----------------------|
| AL | Albanie                   | ES | Espagne                                       | LS | Lesotho                                  | SI | Slovénie              |
| AM | Arménie                   | FI | Finlande                                      | LT | Lituanie                                 | SK | Slovaquie             |
| AT | Autriche                  | FR | France  | LU | Luxembourg                               | SN | Sénégal               |
| AU | Australie                 | GA | Gabon   | LV | Lettonie                                 | SZ | Swaziland             |
| AZ | Azerbaïdjan               | GB | Royaume-Uni                                   | MC | Monaco                                   | TD | Tchad                 |
| BA | Bosnie-Herzégovine        | GE | Géorgie                                       | MD | République de Moldova                    | TG | Togo                  |
| BB | Barbade                   | GH | Ghana   | MG | Madagascar                               | TJ | Tadjikistan           |
| BE | Belgique                  | GN | Guinée  | MK | Ex-République yougoslave<br>de Macédoine | TM | Turkménistan          |
| BF | Burkina Faso              | GR | Grèce   | ML | Mali                                     | TR | Turquie               |
| BG | Bulgarie                  | HU | Hongrie                                       | MN | Mongolie                                 | TT | Trinité-et-Tobago     |
| BJ | Bénin                     | IE | Irlande                                       | MR | Mauritanie                               | UA | Ukraine               |
| BR | Brésil                    | IL | Israël  | MW | Malawi                                   | UG | Ouganda               |
| BY | Bélarus                   | IS | Islande                                       | MX | Mexique                                  | US | Etats-Unis d'Amérique |
| CA | Canada                    | IT | Italie  | NE | Niger                                    | UZ | Ouzbékistan           |
| CF | République centrafricaine | JP | Japon   | NL | Pays-Bas                                 | VN | Viet Nam              |
| CG | Congo                     | KE | Kenya   | NO | Norvège                                  | YU | Yougoslavie           |
| CH | Suisse                    | KG | Kirghizistan                                  | NZ | Nouvelle-Zélande                         | ZW | Zimbabwe              |
| CI | Côte d'Ivoire             | KP | République populaire<br>démocratique de Corée | PL | Pologne                                  |    |                       |
| CM | Cameroun                  | KR | République de Corée                           | PT | Portugal                                 |    |                       |
| CN | Chine                     | KZ | Kazakhstan                                    | RO | Roumanie                                 |    |                       |
| CU | Cuba                      | LC | Sainte-Lucie                                  | RU | Fédération de Russie                     |    |                       |
| CZ | République tchèque        | LI | Liechtenstein                                 | SD | Soudan                                   |    |                       |
| DE | Allemagne                 | LK | Sri Lanka                                     | SE | Suède                                    |    |                       |
| DK | Danemark                  | LR | Libéria                                       | SG | Singapour                                |    |                       |
| EE | Estonie                   |    |   |    |  |    |                       |

SELECTION ET UTILISATIONS DE SOUCHES DE BACTERIES  
LACTIQUES MODULATRICES DE L'IMMUNITE NON-SPECIFIQUE

L'invention est relative à l'utilisation de bactéries lactiques en tant que régulateurs de l'inflammation de la muqueuse intestinale.

Les bactéries lactiques sont traditionnellement utilisées pour fabriquer des produits alimentaires fermentés, en particulier des produits laitiers.

Il a été rapporté qu'outre leurs qualités nutritionnelles, certains de ces produits alimentaires exerçaient des effets bénéfiques sur la santé ; ces propriétés ont fait l'objet d'un intérêt particulier depuis quelques décennies, et de nombreuses recherches ont été effectuées dans le but de les confirmer, et de définir plus précisément le rôle joué par les ferments lactiques.

Il a ainsi été montré que certaines bactéries lactiques, notamment parmi les lactobacilles et des bifidobactéries, amélioraient l'immunité vis-à-vis d'agents infectieux [PAUBERT-BRAQUET et al., Int. J. Immunother. 11, 153-161 (1995) ; KAILA et al., Dis. Child. 72, 51-53 (1995) ; HUDAULT et al. Appl. Environ. Microbiol. 63, 513-518 (1997)], et possédaient également une activité antitumorale [HAYATSU et al. Cancer Lett. 73, 173-179 (1993) ; HOSONO et al. Agric. Biol. Chem. 54, 1639-1643 (1990) ; HOSODA et al. J. Dairy Sci. 75, 976-981 (1992)].

Ces effets ont été notamment attribués à une action sur la composition de la microflore intestinale, au détriment des microorganismes pathogènes, et/ou à une action plus directe sur le système immunitaire, se manifestant en particulier par une augmentation du taux de cytokines activatrices du système immunitaire telles que l'IFN $\gamma$  ou des interleukines, ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules activées intervenant dans la

réponse immune spécifique ou non-spécifique, telles que les lymphocytes et les macrophages, et une sécrétion accrue d'immunoglobulines [PERDIGON et al. Int. J. Immunother. 9, 29-52, (1993) ; PORTIER et al., Int. J. Immunother. 9, 217-224 (1993) ; SOLIS PEREYRA et LEMONNIER, Nutr. Research 13, 1127-1140 (1993)] ; DE SIMONE et al., Int. J. Immunother. 9, 23-28 20 (1993) ; PERDIGON et al. J. Dairy Res. 61, 553-562 (1994) ; SCHIFFRIN et al. J. Dairy Sci. 78, 491-497 (1995)].

10                   Cependant, il apparaît que les effets bénéfiques induits par les bactéries lactiques peuvent varier selon l'origine de la pathologie concernée, l'espèce et/ou la souche bactérienne utilisée, et les conditions d'administration. Pour mieux adapter  
15 l'utilisation de ces bactéries, ou des produits les contenant, dans le cadre du traitement ou de la prévention de pathologies spécifiques, et pour être en mesure de sélectionner les bactéries les plus appropriées à l'utilisation souhaitée, il est donc nécessaire de  
20 mieux connaître les mécanismes par lesquels s'exercent leurs effets.

Les Inventeurs ont entrepris d'étudier l'effet sur la muqueuse intestinale de bactéries lactiques du groupe *Lactobacillus casei* ; ils ont choisi dans ce but  
25 la souche de *L. casei* DN 114001. Cette souche est décrite dans la Demande PCT WO 96/20607 au nom de : COMPAGNIE GERVAIS DANONE, et a été déposée le 30 décembre 1994, auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes) tenue par l'Institut Pasteur, 25 rue du  
30 Docteur Roux, à Paris, sous le numéro I-1518, et ses propriétés bénéfiques dans le cadre du traitement des diarrhées ont été montrées.

Les inventeurs ont étudié l'effet *in vitro* de cette souche de *L. casei* sur la production de médiateurs  
35 de l'immunité non-spécifique (cytokines pro-

inflammatoires et oxyde nitrique) par des entérocytes en culture.

Ces lignées de cellules, qui sont issues de l'épithélium intestinal humain, constituent un modèle d'étude de la réponse de celui-ci à une agression, infectieuse ou autre. Cette réponse se manifeste notamment par la production de cytokines pro-inflammatoires (principalement IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ), et d'oxyde nitrique (NO), généré par une isoforme inducible de la NO synthase (iNOS). L'oxyde nitrique participe, par ses propriétés antimicrobiennes, à la défense contre les microorganismes pathogènes, et lorsqu'il est produit en faible quantité, à la protection de la muqueuse intestinale. Cependant, à forte dose, il diminue la viabilité des cellules épithéliales, et contribue à l'instauration et à l'entretien d'un état inflammatoire chronique [ALICAN et KUBES, Am. J. Physiol. 270, G225-237, (1996) ; TEPPERMAN et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 271, 1477-1482, (1994)]. La production de NO par les entérocytes en culture peut être induite par les cytokines pro-inflammatoires [VALETTE et al., Br. J. Pharmacol., 121, 187-182 (1997) ; KOLIOS et al., Br. J. Pharmacol., 116, 2866-2872 (1995) , ainsi que par les toxines lipopolysaccharidiques (LPS) de certaines bactéries à gram négatif (TEPPERMAN et al, 1994, publication précitée). Des travaux récents [SALZMAN et al. Gastroenterology, 114, 93-102, (1998) ; WITTHOFT et al., Am. J. Physiol., 275, G564-571, (1998)] indiquent que les bactéries entéropathogènes *Escherichia coli*, *Salmonella dublin*, *Shigella flexneri*, induisent l'expression de l'iNOS et la production de NO dans des cultures d'entérocytes, pré-activées ou non par des cytokines pro-inflammatoires.

Les inventeurs ont maintenant constaté que, dans le cas de leurs expérimentations avec *L. casei*, l'action sur la production de cytokines pro-

inflammatoires et de NO variait selon l'état d'activation des entérocytes. En effet, lorsque les cellules sont dans leur état basal, on n'observe aucun effet de *L. casei* ; lorsqu'elles sont activées par l'addition de cytokines pro-inflammatoires (ce qui reproduit les conditions d'une agression, infectieuse ou autre), on observe une faible production de NO et de TNF ; cette réponse à l'agression est très significativement augmentée par l'addition de *L. casei*. Enfin, dans le cas de cellules hyperactivées par l'addition de cytokines inflammatoires et de LPS (ce qui reproduit les conditions d'un état inflammatoire pathogène), on observe au contraire une diminution de la production de NO et de TNF, qui est ramenée à un niveau optimal.

Il apparaît donc que cette souche de *L. casei* favorise une réponse adaptative des cellules à une agression, par l'intermédiaire de la modulation de facteurs intervenant dans l'immunité non-spécifique.

La mise en évidence de ces propriétés permet de proposer l'utilisation de la souche CNCM I-1518 de *L. casei*, et/ou de toute autre souche de bactérie lactique capable de diminuer la production de NO par des cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires et des LPS bactériens, pour l'obtention de compositions régulatrices de la réponse inflammatoire des entérocytes, et en particulier inhibitrices d'une réponse inflammatoire pathogène.

Avantageusement, on utilisera une souche capable en outre d'augmenter la production de NO par des cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires.

Les compositions obtenues sont utilisables pour la prévention ou le traitement de pathologies inflammatoires aiguës ou chroniques de l'intestin (colites, entérites, maladie de Crohn, rectocolites hémorragiques, etc.), que ces pathologies soient

d'origine infectieuse (induites par des bactéries, des virus, des levures, etc.) ou non ; elles sont particulièrement appropriées dans le cadre du traitement des états inflammatoires chroniques.

5 Conformément à l'invention, les bactéries lactiques peuvent être utilisées sous forme de bactéries entières vivantes ou non, sous forme de lysat bactérien, ou sous forme de fractions bactériennes ; les fractions  
10 bactériennes convenant à cette utilisation peuvent être choisies en testant leurs propriétés d'augmentation de la production de NO par des cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires, et de diminution de la production de NO par des cultures  
15 d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires et des LPS bactériens.

Préférentiellement, ces compositions peuvent être administrées sous forme de compléments alimentaires. Il peut s'agir notamment de produits laitiers fermentés ; dans ce cas, les bactéries lactiques utilisées,  
20 conformément à l'invention, pour l'obtention de ces compositions peuvent faire partie du ferment mis en œuvre pour l'obtention de ces produits laitiers.

On peut notamment utiliser des bactéries lactiques choisies parmi les lactobacilles, les  
25 lactocoques, les streptocoques et les bifidobactéries. Avantageusement, on utilise une souche de *L. casei*, et de préférence, la souche CNCM I-1518.

De nouvelles souches de bactéries lactiques dotées de propriétés modulatrices de l'immunité non-  
30 spécifique, et utilisables notamment pour l'obtention de compositions régulatrices de la réponse inflammatoire des entérocytes, peuvent être obtenues par la mise en œuvre d'un procédé de criblage comprenant la sélection de souches de bactéries lactiques capables de diminuer la  
35 production de NO par des cultures d'entérocytes



préactivés par des cytokines pro-inflammatoires et des LPS bactériens.

Avantageusement, ledit procédé comprend en outre une étape de sélection des souches capables d'augmenter la production de NO par des cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires, et optionnellement, une étape de sélection des souches n'exerçant aucun effet sur la production de NO par des entérocytes non-activés.

Selon un mode de mise en œuvre préféré du procédé conforme à l'invention, lesdites souches sont criblées à partir de cultures de bactéries lactiques choisies dans le groupe constitué par les lactobacilles, les lactocoques, les streptocoques et les bifidobactéries.

L'invention englobe également les aliments et compléments nutritionnels, notamment les produits laitiers fermentés contenant ces nouvelles souches, ou des produits dérivés de celles-ci, notamment par lyse et/ou fractionnement cellulaire.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs illustrant la mise en évidence des propriétés de la souche CNCM I-1518.

#### 25 PROTOCOLES EXPERIMENTAUX GENERAUX :

Les cytokines recombinantes humaines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , 10<sup>7</sup> U/mg) utilisées proviennent de la société IMMUGENEX (Los Angeles, CA) ; le PDTC (inhibiteur de la formation du facteur de transcription NF $\kappa$ -B), le L-NAME (inhibiteur des NO-synthases), et le lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* proviennent de la société SIGMA (St Louis, MO).

Les kits de dosage par ELISA des cytokines IL-1 $\beta$ , et TNF- $\alpha$  proviennent de la société BIOSOURCE.

Les extraits totaux de *L. casei* utilisés lors des expériences sont obtenus par sonication pendant 10

minutes de suspensions de la souche CNCM I-1518, afin de casser les bactéries.

Culture et stimulation des entérocytes :

Les 2 lignées de cellules de carcinome du colon HT29 et Caco-2 ont été utilisées.

La lignée HT29, initialement isolée par FOGH et TREMPE (Human Tumor Cells *In Vitro*, 115-156, J. FOGH Ed, Plenum Press, New York, 1975) est disponible auprès de la collection ATCC, (Rockville USA), sous le numéro ATCC HTB-38.

La lignée Caco-2, initialement isolée par FOGH (J. Natl. Cancer Inst. 58, 209-214, 1977) est disponible auprès de la collection ATCC, (Rockville USA), sous le numéro ATCC HTB-37.

Légendes des figures :

La figure 1 représente la production de NO par les cellules Caco-2, préactivées (●) ou non (○) par le CYTOMIX, ou par les cellules HT-29 préactivées (■) ou non (□) par le CYTOMIX, en présence de quantités croissantes d'extrait total de la souche CNCM I-1518.

La figure 2 représente l'effet du L-NAME sur la production de NO par les cellules Caco-2 ou par les cellules HT-29 préactivées par le CYTOMIX, en présence ou non d'extrait total (3% v/v) de la souche CNCM I-1518.

(//) + L-NAME  
(■) Contrôle

La figure 3 représente l'effet du L-NAME et du PDTC sur la production de TNF par les cellules Caco-2 ou par les cellules HT-29 préactivées par le CYTOMIX, en présence ou non d'extrait total (3% v/v) de la souche CNCM I-1518.

(//) + L-NAME  
(■) Contrôle  
(≡) + PDTC

La figure 4 représente la production de NO par les cellules Caco-2, préactivées par le CYTOMIX seul (○)

ou par le CYTOMIX+LPS (●), ou par les cellules HT-29 préactivées par le CYTOMIX seul (□) ou par le CYTOMIX+LPS (■), en présence de quantités croissantes d'extrait total de la souche CNCM I-1518.

5 **EXEMPLE 1 : EFFET DE *L. CASEI* SUR LA PRODUCTION D'OXYDE NITRIQUE PAR LES LIGNEES DE CELLULES EPITHELIALES DU COLON.**

Chacune des 2 lignées a étéensemencée à  $2 \times 10^5$  cellules/puits en plaques de 96 puits, en milieu DMEM  
10 supplémenté de 5% de SVF, de 100 U/ml de pénicilline, de 100 µg/ml de streptomycine et de 2 mM de L-glutamine.

Les cellules sont pré-incubées pendant 24 heures à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, en présence de CYTOMIX (mélange IL-1β : 10 ng/ml, TNF-α : 25 ng/ml, IFN-γ : 10<sup>3</sup> U/ml). Les  
15 cellules sont ensuite incubées pendant 24 heures supplémentaires en présence ou non de quantités croissantes d'extraits totaux de *L. casei* (en % vol/vol).

Après l'incubation, les surnageants de culture sont récupérés et congelés avant la détermination de la  
20 concentration en nitrites. Pour certaines expériences, du L-NAME (1 mM), qui est un analogue de la L-arginine et constitue un inhibiteur compétitif spécifique des NO-synthases est ajouté en même temps que les extraits de *L. casei*.

25 La quantité de NO produit est évaluée par le dosage dans les surnageants de culture, des dérivés stables de ce radical après sa réaction en milieu aqueux: les nitrites et les nitrates. Les nitrates sont dans un premier temps réduits en nitrites par des bactéries  
30 exprimant la nitrate-réductase et les nitrites sont ensuite dosés par la méthode de GRIESS. A 100 µl de surnageant on ajoute 100 µl d'une solution composée de 1 volume d'une solution de sulfanilamide à 1% dans l'acide acétique à 30%, et de 1 volume d'une solution de  
35 dichlorhydrate de N-1-naphtyl éthylènediamine à 0,1% dans l'acide acétique à 60%. Une courbe de calibration

standard est réalisée en présence de différentes concentrations de nitrite de sodium dilué dans du milieu de culture (DMEM 5%SVF). Les absorbances sont ensuite déterminées à 540 nm en utilisant un lecteur MULTISCAN 5 MCC340, (LABSYSTEM)

La figure 1 montre qu'en présence du CYTOMIX seul, on n'observe qu'une production limitée de NO par les lignées HT-29 et Caco-2 ; cette production est augmentée de façon dose-dépendante par l'addition de l'extrait de *L. casei*. Un effet maximal est observé pour une concentration d'environ 3% (v/v) d'extrait de *L. casei*. En l'absence de CYTOMIX, *L. casei* n'a pas d'effet sur la production de NO par l'une ou l'autre des lignées.

La figure 2 montre que cette production induite par le CYTOMIX est inhibée par l'addition de L-NAME, en présence ou non d'extrait total de *L. casei* (3% v/v).

**EXEMPLE 2 : EFFET DE *L. CASEI* SUR LA PRODUCTION DE TNF- $\alpha$  PAR LES LIGNEES DE CELLULES EPITHELIALES DU COLON.**

Chacune des 2 lignées a étéensemencée à  $2 \times 10^6$  cellules/puits en plaques de 24 puits, en milieu DMEM supplémenté de 5% de SVF, de 100 U/ml de pénicilline, de 100  $\mu$ g/ml de streptomycine et de 2 mM de L-glutamine. Les cellules sont ensuite incubées pendant 24 heures en présence de CYTOMIX, puis pendant 24 heures supplémentaires en présence des extraits totaux de *L. casei*. Pour certaines expériences, du L-NAME (1 mM) ou un inhibiteur de la voie de transduction NF $\kappa$ B (le PDTC: 10 pM) sont ajoutés en même temps que les extraits bactériens.

Les surnageants de culture sont ensuite récupérés et leur concentration en cytokines déterminées par ELISA.

La figure 3 montre qu'en présence du CYTOMIX seul, il n'y a qu'une faible production de TNF- $\alpha$  par la lignée Caco-2, et une absence de production de cette

cytokine par la lignée HT-29. Cette production est fortement augmentée, pour les deux lignées, par l'addition d'extrait total de *L. casei* ; elle est inhibée par l'addition de L-NAME ou de PDTC, ce qui montre que l'activation de la production de cytokines pro-inflammatoires par *L. casei* fait intervenir la production de NO et l'activation de NF $\kappa$ B.

Les résultats présentés dans le tableau I ci-après montrent que l'addition de *L. casei* aux cellules préactivées par le CYTOMIX active également la production d'IL-1 $\beta$ .

TABLEAU I

| Cellule | Préactivation | Stimulation | IL1- $\beta$ (pg/ml) | TNF- $\alpha$ (pg/ml) |
|---------|---------------|-------------|----------------------|-----------------------|
| Caco-2  | Aucune        | Aucune      | ND                   | ND                    |
| Caco-2  | CYTOMIX       | Aucune      | 150 $\pm$ 15         | 75 $\pm$ 11           |
| Caco-2  | Aucune        | CNCM I-1518 | 95 $\pm$ 8           | ND                    |
| Caco-2  | CYTOMIX       | CNCM I-1518 | 1254 $\pm$ 55        | 975 $\pm$ 85          |
| HT-29   | Aucune        | Aucune      | ND                   | ND                    |
| HT-29   | CYTOMIX       | Aucune      | ND                   | ND                    |
| HT-29   | Aucune        | CNCM I-1518 | ND                   | ND                    |
| HT-29   | CYTOMIX       | CNCM I-1518 | 908 $\pm$ 63         | 789 $\pm$ 45          |

ND : NON DETERMINE

**EXEMPLE 3 : EFFET DE *L. CASEI* EN PRESENCE DE LPS DE BACTERIES GRAM<sup>-</sup>, SUR LA PRODUCTION D'OXYDE NITRIQUE PAR LES LIGNEES DE CELLULES EPITHELIALES DU COLON PRE-ACTIVEES PAR DES CYTOKINES PROINFLAMMATOIRES.**

Le protocole est identique à celui de l'exemple 1 ci-dessus, à ceci près que 10  $\mu$ g/ml de LPS d'*E. coli* sont ajoutés lors de l'incubation avec l'extrait total de *L. casei*.

Les résultats sont illustrés par la figure 4, qui montre une production importante de NO en l'absence de *L. casei* (cellules stimulées par CYTOMIX + LPS), qui diminue en présence de quantités croissantes de *L. casei*,

jusqu'à revenir au niveau de celle des cellules activées par les cytokines seules.

## REVENDICATIONS

- 1) Utilisation d'une souche de bactérie lactique capable de diminuer la production de NO par des cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires et des LPS bactériens, pour l'obtention d'une composition régulatrice de la réponse inflammatoire des entérocytes.
- 2) Utilisation selon la revendication 1 caractérisée en ce que ladite souche est en outre capable d'augmenter la production de NO par des cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires
- 3) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que ladite souche bactérienne est une souche de *L. casei*.
- 4) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ladite souche bactérienne est la souche de *L. casei* CNCM I-1518.
- 5) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ladite composition est sous la forme d'un complément alimentaire.
- 6) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ladite composition est sous la forme d'un produit laitier fermenté.
- 7) Procédé de criblage de nouvelles souches de bactéries lactiques dotées de propriétés modulatrices de l'immunité non-spécifique, caractérisé en ce qu'il comprend la sélection de souches de bactéries lactiques capables d'inhiber la production de NO par des cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires et des LPS bactériens.
- 8) Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape de sélection des souches capables d'augmenter la production

de NO par des cultures d'entérocytes préactivés par des cytokines pro-inflammatoires, et optionnellement, une étape de sélection des souches n'exerçant aucun effet sur la production de NO par des entérocytes non-activés.

- 5                   9) Procédé selon une quelconque des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce que lesdites souches sont criblées à partir de cultures de bactéries lactiques choisies dans le groupe constitué par les lactobacilles, les lactocoques, les streptocoques et les  
10 bifidobactéries.



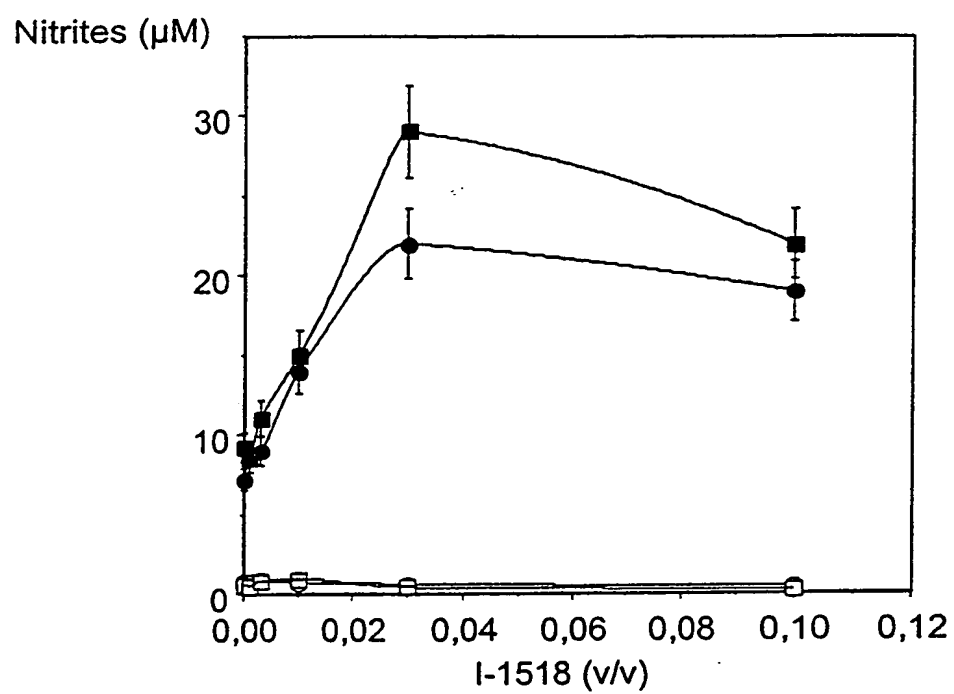


FIG. 1.

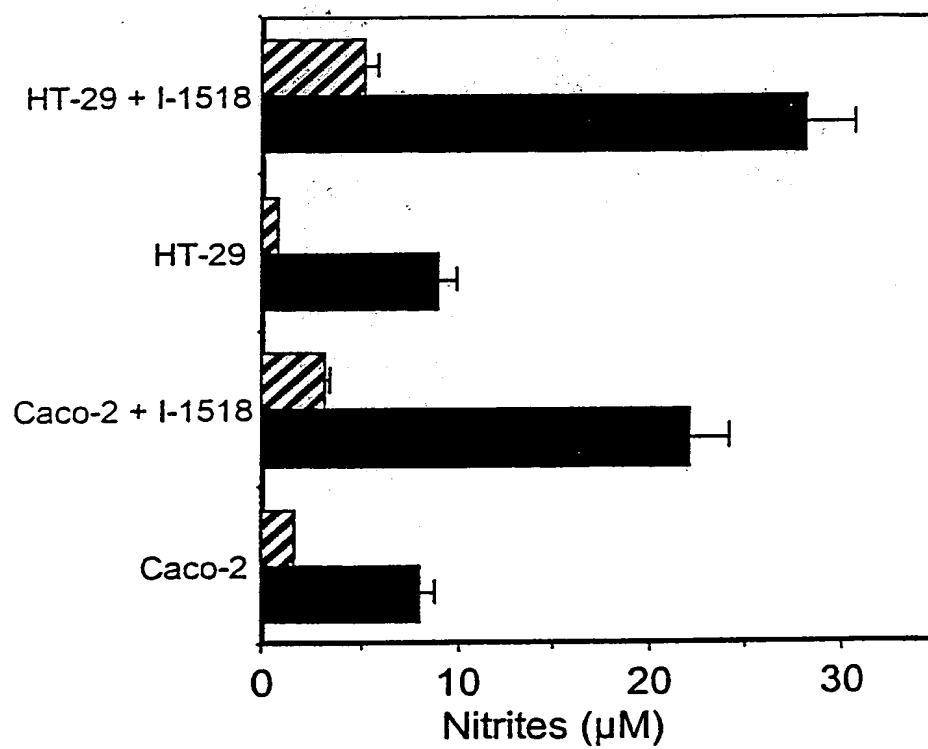


FIG. 2.

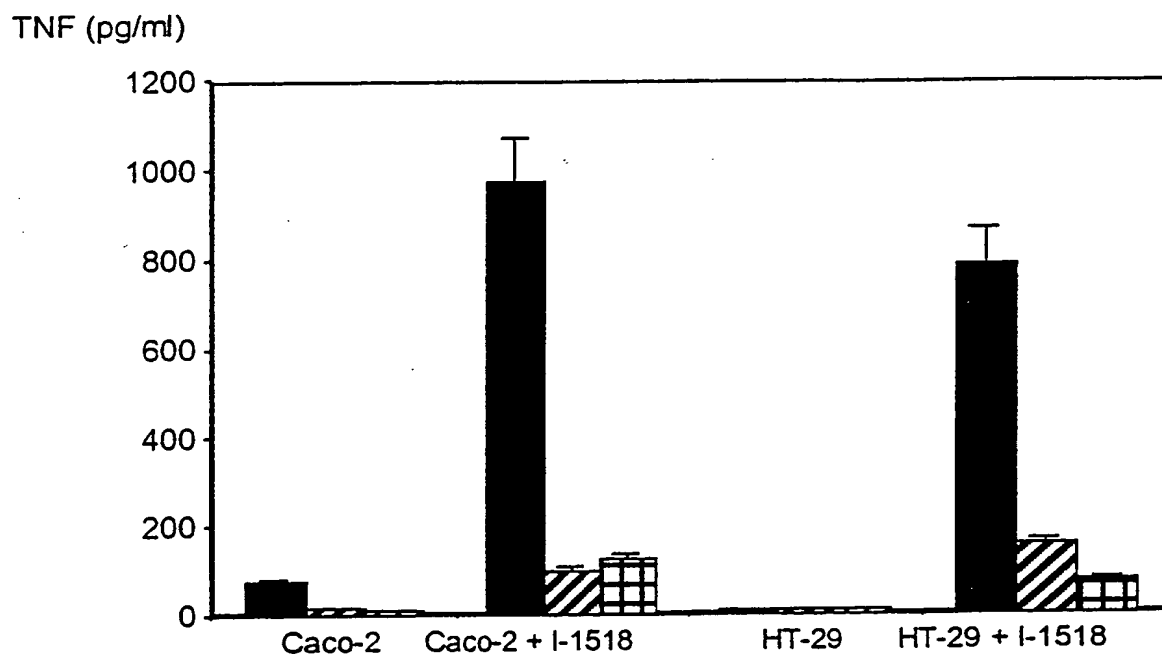


FIG. 3.

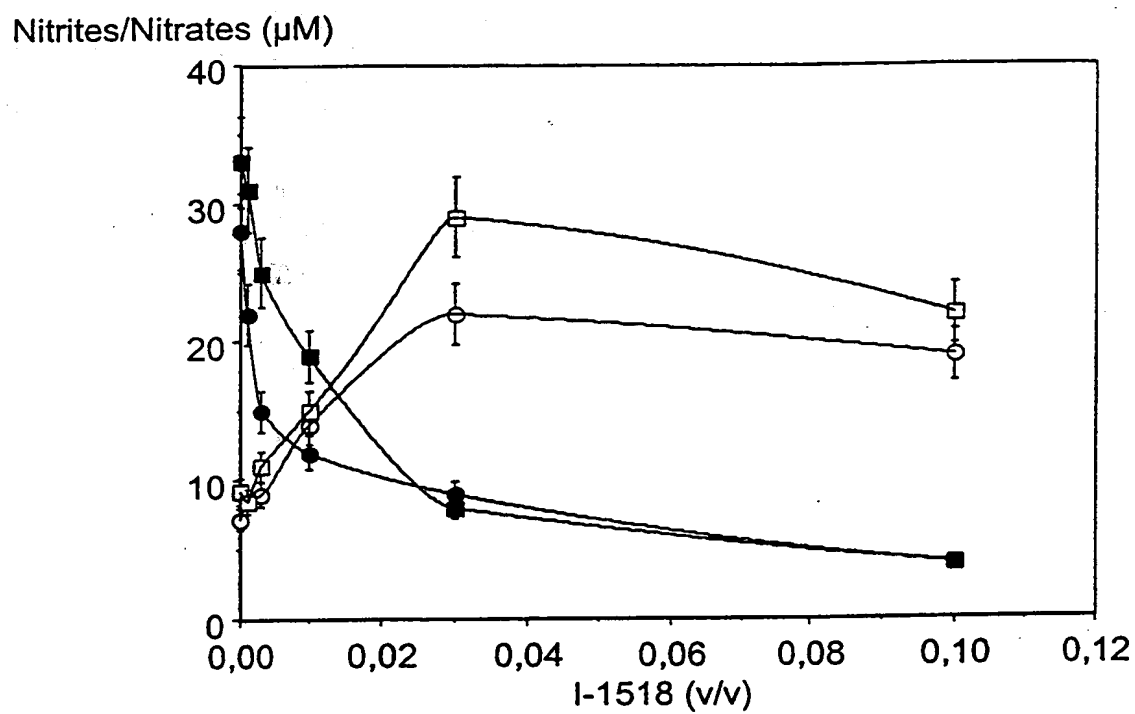


FIG. 4.